

ZUR KONSTITUTION DES INSULINS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT
zu
M Ü N C H E N

vorgelegt von
Dr. med. Ernold Granzer
aus
Troppau

Oktober 1958

Digitized by the Internet Archive
in 2026



1. Referent (Berichterstatter): Prof. Dr. W. Graßmann
 2. Referent (Mitberichterstatter): Prof. Dr. F. Lynen
- Tag der mündlichen Prüfung: 27. V. 1959

I. Problem und Aufgabenstellung:

Die vom SANGERSchen Arbeitskreis in zehnjähriger Arbeit postulierte Strukturformel des Insulins war in einzelnen Sequenzen nicht ganz beweiskräftig gesichert. Durch Abbau mit Chymotrypsin wurde daher Insulin in kleinere Bruchstücke zerlegt, die präparativ zu trennen mit verschiedenen Methoden, elektrophoretisch, verteilungs- und ionenaustauschchromatographisch, versucht wurde. Die isolierten und auf ihre Reinheit geprüften Peptiden wurden weiterhin auf ihre Aminosäurezusammensetzung, ihre Amino- und Carboxylendgruppe, sowie im Falle der fraglichen Sequenz auf ihre Aminosäuresequenz untersucht.

II. Eigene Ergebnisse:

1) Der Chymotrypsinabbau von Insulin

Der Chymotrypsinabbau von Insulin liefert bei einem Enzym-Substratverhältnis von 1 : 25 und einem pH-Wert von 8,3 bereits nach etwa 7 Std. und anschließend gleichbleibend pro Mol Insulin 9 freie Carboxylgruppen, die sich auf mindestens 24 papierchromatographisch nachweisbare Bruchstücke verteilen. Insulin besitzt 7 aromatische Aminosäuren im Molekül. Nach der weitverbreiteten Ansicht, daß Chymotrypsin nur an der Carboxylgruppe der aromatischen Aminosäuren spaltet, was mit dem experimentellen Ergebnis nicht in Einklang zu bringen ist, sollten also 7 freie neue Carboxylgruppen entstehen. Für das Auftreten von mehr Bruchstücken beim Chymotrypsinabbau von Insulin gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten.

- a) Eine ist dadurch gegeben, daß die Spezifität des Chymotrypsins offensichtlich doch weniger scharf ist als es die BERGMANNSchule annahm.

Darauf deuten auch einige Ergebnisse in der neueren Literatur, wonach Chymotrypsin - wenn auch langsamer - Bindungen angreift, an denen Aminosäuren mit einer großen neutralen Seitenkette mittels ihrer Carboxylgruppe beteiligt sind, so z.B. Leucin, Isoleucin, Asparagin, Methioninsulfon, Tryptophan, aber auch Histidin und Cysteinsäure.

Diese Befunde bieten eine Erklärung, weshalb nicht 7, sondern mehr, nämlich 9 neue Carboxylgruppen auftreten. Sie erklären jedoch nicht, warum die Menge neu auftretender Carboxylgruppen bedeutend geringer als die Anzahl von Bruchstücken ist. Man muß daher als weiteren Gesichtspunkt gleichzeitig

- b) die unvollkommene Spaltung an und für sich durch Chymotrypsin spaltbarer Bindungen heranziehen.

Bei einem Peptid a-b-c, dessen Bruchstücke a, b und c fermentativ herausgespalten werden können, erhält man unter der Annahme vollständiger Spaltung 2 neue Carboxylgruppen und 3 Bruchstücke, nämlich a, b, c. Unter der Annahme, daß jede der spaltbaren Bindungen jedoch nur zu 50% gespalten wird, steht einem Carboxylzuwachs von nur 1 Äquivalent das Auftreten von 5 Bruchstücken, nämlich a, b, c, ab, bc, neben dem Ausgangsprodukt abc gegenüber. Als Endresultat findet man also 1 Mol neue Carboxylgruppen und 6 verschiedenartige Substanzen.

Diese durch Bruchstückvermehrung bedingte Erhöhung des komplexen Charakters des Trenngemisches ist für die schwierige Trennung verantwortlich.

Eine Vermehrung der Bruchstücke, die ebenfalls nicht notwendigerweise mit einer Vermehrung der freigesetzten Carboxylgruppen/Mol Hand in Hand gehen muß - erfolgt auch durch

- c) sekundäre Veränderungen an aminoständigen Glutaminresten, die durch Cyclisierung in Pyrrolidinocarbonsäurereste umgewandelt werden.

Stets ist auch mit der Möglichkeit

- d) echter Resynthesen, zu rechnen, welche die Anzahl von Peptidkombinationen bei gleichbleibender Zahl der Carboxylgruppen beträchtlich erhöhen können.

Die Vermehrung der Peptidkombinationen auf Grund einer Disulfidaustauschreaktion ist wegen des Zusatzes des Hemmstoffes N-Äthylmaleinimid zum inkubierten Ansatz in meinen Versuchen allerdings unterbunden.

- e) Die Abspaltung von Amidgruppen, die zu einer Vermehrung sowohl der Bruchstücke als auch der freien Carboxylgruppen führt, wäre im Laufe der Aufarbeitung nur durch saure oder alkalische Hydrolyse möglich, nicht aber durch Einwirkung von Chymotrypsin selbst, ist aber infolge der schonenden Aufarbeitung unwahrscheinlich.

2) Die Trennung des Abbaugemisches

Nachdem sich das kontinuierliche präparativ-elektrophoretische Trennverfahren auch in der von mir eingeführten Methodik des Zusatzes wasserstoffbrückensprengender Stoffe zum Trenngemisch für das vorliegende Trennproblem als zu wenig selektiv erwiesen hatte - obwohl es an weniger komplexen Trenngemischen eine sehr weitgehende Verbesserung des Trenneffektes bewirkte - und auch verteilungschromatographische Versuche an Cellulosesäule nicht zu dem gewünschten Trenneffekt führten, wurden ionenaustauschchromatographische Methoden auf ihre Eignung geprüft. In analytischem Maßstab durchgeführte Vorversuche an einer Dowex 50-X4-Säule der Ausmaße 45 x 1,1 cm, unter Elution mit stufenweisem Pufferwechsel von pH 3,42 bis zum pH einer 0,2n-NaOH bei konstanter Normalität der Na^+ -Ionen, ließen das Dowex-50-System für eine präparative Trennung des Chymotrypsinabbaugemisches von Insulin als geeignet erscheinen. Diese Trennung wurde an einer 150 x 2 cm-Säule von Dowex 50-X2 mittels der Gradientenelution durchgeführt, wobei pH und Na^+ -Konzentration der eluierenden Pufferlösung kontinuierlich von (pH 3,1 0,2n- Na^+) gegen (pH 5,1 2n- Na^+) anstiegen und die letzten Peptide mit 2n- $[\text{Na}^+]$ bei pH 6,44 aus der Säule eluiert wurden. Die auf Grund der Ninhydrinanfärbung einer abgezweigten Probe lokalisierten Fraktionen wurden durch Gefriertrocknung von der Flüssigkeit befreit. Die zusammen mit dem Peptidmaterial zurückbleibenden nichtflüchtigen Puffersalze wurden ionenaustauschchromatographisch entsalzt, wozu die im folgenden Abschnitt beschriebenen Verfahren ausgearbeitet wurden.

3) Die Entsalzung der Peptide

- a) Entsalzung an einem starken Kationenaustauscher mit Sulfonsäuregruppen (Dowex 50-X2).

Methode 1:

Die mit 0,2n-Ammoniumformiatpuffer auf pH 3,2 äquilibrierte Säule wird mit Entsalzungsgemisch beschickt; bei pH 5,1 wird mit 0,2n-Ammoniumacetat salzfrei gewaschen und das Peptid mit 0,05n-Ammoniak eluiert.

Methode 2:

Die Säule wird mit einem nichtflüchtigen Citratpuffer von pH 3,3 äquilibriert. Nach Auftreten der zu entsalzenden Lösung wird mit 0,01n-Essigsäure salzfrei gewaschen und mit 0,05n-Ammoniak eluiert.

Methode 3:

Der nichtflüchtige 0,1n-Citratpuffer der Methode 2 wurde beim Äquilibrieren der Säule durch einen flüchtigen 0,2n-Ammoniumformiatpuffer von pH 3,1 ersetzt. Das sonstige Vorgehen entspricht der Methode 2.

- b) Entsalzung an einem starken Anionenaustauscher mit Trimethylbenzyl-ammoniumgruppierung (Dowex 1-X2).

Methode 4:

Auf die neutral gewaschene Dowex 1-X2-Säule in der OH^- -Form wird die zu entsalzende Lösung aufgegeben; mit Wasser wird bis zur neutralen Reaktion des Eluats nachgewaschen und das Peptid mit 1n-Essigsäure eluiert, wobei das Wandern des Peptids durch die Säule an Hand der Farbveränderung des Harzes leicht mit dem Auge verfolgt werden kann. Auf die gleiche Weise lassen sich auch Verunreinigungen eines Peptids oder einer Aminosäure durch (auch sehr große Mengen) Harnstoff oder Zucker beseitigen, die bei der Elektrophorese unter Zusatz von Harnstoff als Wasserstoffbrückensprenger bzw. bei Aufarbeitung von Glykoproteiden auftreten.

Die Anwendung der vier Fraktionierungsmethoden auf die einzelnen Fraktionen der Ionenaustauschchromatographischen Trennung ist aus Tabelle 1 ersichtlich, in der auch die Ausbeuteverhältnisse angegeben sind. Allerdings sind einige dieser Fraktionen noch durch geringe Mengen von Salzen verunreinigt, so daß für die aufgeklärten Fraktionen die wahren, auf Grund quantitativer Aminosäurebestimmungen berechneten Ausbeuteverhältnisse aus Tabelle 5 zu entnehmen sind.

In Tabelle 2 finden sich die Angaben über qualitative Zusammensetzung der Fraktionen, deren papierchromatographisch geprüften R_F -Werte und ihren pI -Wert im System Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser 4:1:1:5.

Tabelle 1

Ausbeuteverhältnisse und angewandte Entsalzungsmethode der bei der Ionenaustauschchromatographischen Trennung erhaltenen Peptide.

Fraktion Nr.	Entsalzungs- methode	Ausbeute in	
		mg	% d. einges. Insulinmenge
1	3	11,1	1,3
2	2	20,5	2,7
3	2	1,6	0,2
4	2	1,2	0,2
5	4	1,1	0,2
6	4	1,8	0,3
7	3	1,8	0,2
8	3	1,1	0,1
9	4	1,7	0,2
10	2	1,8	0,2
11	2	1,8	0,2
12	2	1,8	0,2
13	2	1,8	0,2
14	2	1,8	0,2
15	2	1,8	0,2
16	2	1,8	0,2
17	2	1,8	0,2
18	2	1,8	0,2
19	2	1,8	0,2
20	2	1,8	0,2
21	2	1,8	0,2
22	2	1,8	0,2
23	2	1,8	0,2
24	2	1,8	0,2
25	2	1,8	0,2
26	2	1,8	0,2
27	2	1,8	0,2
28	2	1,8	0,2
29	2	1,8	0,2
30	2	1,8	0,2
31	2	1,8	0,2
32	2	1,8	0,2
33	2	1,8	0,2
34	2	1,8	0,2
35	2	1,8	0,2
36	2	1,8	0,2
37	2	1,8	0,2
38	2	1,8	0,2
39	2	1,8	0,2
40	2	1,8	0,2
41	2	1,8	0,2
42	2	1,8	0,2
43	2	1,8	0,2
44	2	1,8	0,2
45	2	1,8	0,2
46	2	1,8	0,2
47	2	1,8	0,2
48	2	1,8	0,2
49	2	1,8	0,2
50	2	1,8	0,2
51	2	1,8	0,2
52	2	1,8	0,2
53	2	1,8	0,2
54	2	1,8	0,2
55	2	1,8	0,2
56	2	1,8	0,2
57	2	1,8	0,2
58	2	1,8	0,2
59	2	1,8	0,2
60	2	1,8	0,2
61	2	1,8	0,2
62	2	1,8	0,2
63	2	1,8	0,2
64	2	1,8	0,2
65	2	1,8	0,2
66	2	1,8	0,2
67	2	1,8	0,2
68	2	1,8	0,2
69	2	1,8	0,2
70	2	1,8	0,2
71	2	1,8	0,2
72	2	1,8	0,2
73	2	1,8	0,2
74	2	1,8	0,2
75	2	1,8	0,2
76	2	1,8	0,2
77	2	1,8	0,2
78	2	1,8	0,2
79	2	1,8	0,2
80	2	1,8	0,2
81	2	1,8	0,2
82	2	1,8	0,2
83	2	1,8	0,2
84	2	1,8	0,2
85	2	1,8	0,2
86	2	1,8	0,2
87	2	1,8	0,2
88	2	1,8	0,2
89	2	1,8	0,2
90	2	1,8	0,2
91	2	1,8	0,2
92	2	1,8	0,2
93	2	1,8	0,2
94	2	1,8	0,2
95	2	1,8	0,2
96	2	1,8	0,2
97	2	1,8	0,2
98	2	1,8	0,2
99	2	1,8	0,2
100	2	1,8	0,2

Tabelle 2

Zusammensetzung der Fraktionen.

Fraktion Nr.	Reinheitsgrad	R _F -Wert*	Aminosäurezusammen- setzung
4	einheitlich	0,137	Asp, Ser, Gly, Val, Leu/ Ileu, (Ala) 1 od. 2 Basen (Arg, Hist)
8	einheitlich	0,568	Leu
9	einheitlich	0,114	Glu, Ala (Spur Asp?)
10	einheitlich	0,229	Glu, Gly, Leu/Ileu, Val Spur: Thr, Lys, Ala, Phe, 1 Fleck an typischer Prolin-Position jedoch mit atypischer Prolin- färbung (rotviolett)
11	2 Hauptkomponenten		
12	3 Komponenten	0,057 0,11 0,475	
13	2 Komponenten	0,057 0,12	
14	einheitlich	0,524	Phe, Val, Ala, Ileu/Leu Spuren: Thr, Glu, Cyss, Ser u./od. Gly, Tyr
15	einheitlich	0,135	Val, Glu, Ala, Leu, Tyr,
17	fast einheitl.	0,180	Ileu/Leu, Val, Tyr, Ala, Glu,
18	2 Komponenten	0,124	
19	fast einheitl.	0,127	Glu, Ser u./od. Gly, Ala, Val, Ileu/Leu
20	fast einheitlich	0,12	
21	fast einheitlich	0,078	Asp, Glu, Ser, Gly, Ala, Val, Phe, Ileu/Leu, Spur: His/Lys, Cyss?
22	2 Komponenten	0,537 0,093	
23	1 Hauptkomponente	0,158	
25	fast einheitlich	0,105	Cyss, Asp, Glu, Ser, Gly, Ala, Val, Ileu/Leu, 1 od. 2 Basen
26	einheitlich	0,112	Thr, Pro, Lys, Ala

Tabelle 2 (Fortsetzung)
Zusammensetzung des Proteins

Fraktion Nr.	Reinheit	pH-Wert*	Aminosäurezusammensetzung
28	einheitlich	0,100	Val, Asp, Glu, His, Leu
32	homogen		Ala, Cys, Asp, Glu, Ser, 2 Basen
33a	5 Komponenten	0,100 0,14	Gly, Ala, Cys, Glu, Val, Ileu, Ileu, Leu, Asp
33b	2 Komponenten	0,088 0,14	{Gly, Ala, Cys, Glu, Val, Leu/Ileu
33d	3 Komponenten	0,088 0,14	{Gly, Ala, Cys, Glu, Val, Leu/Ileu Spuren: 2 Basen
40	einheitlich		Tyr, Thr, Pro, Lys, Ala

*1 Die pH-Werte beziehen sich auf das System Butanol-Pyridin-Pyridin/Wasser 4:1:1. Siehe Benlechner & Schütt 1967 b
Faserichtung quer zur Laufrichtung, Methode Benlechner

4) Die Struktur der Peptide:

Die reinen und entsalzten Peptide wurden der quantitativen Aminosäurebestimmung nach der hochommatischen Ionenaustauschchromatographischen Methode an Bover 50-X6 und Labeclite IRC-50, jedoch in einer automatischen arbeitenden Apparatur unterworfen. Die Ergebnisse sind zusammen mit der Endgruppenbestimmung in Tabelle 3 niedergelegt.

Die Aminoendgruppe wurde mittels der NBT-Methode, die Carboxylendgruppe mittels Hydrazinanalyse bestimmt.

Tabelle 3

Quantitative Aminosäureanalyse und Endgruppenbestimmung der reinen Fraktionen.

Aminosäuren (Molverhältnisse)	F r a k t i o n							
	40	28	26	17	15	14	10	8
Ala	1		1	1	1			
Thr	1		1					
Tyr	1			1	2*			
Pro	1		1					
Lys	1							
Asp		1						
Gln		1		1	1		2	
Val		1		1	1		1	
Leu		1		1	1		1	1
His		1						
Phe						1		
Gly							1	
Ileu							1	
N-Endgr.	Tyr	Val	Thr	Leu	Val	-	Gly	-
C-Endgr.	Ala	Leu	Ala	Leu	Tyr	-	Glu	-

*) Dieses Peptid war noch durch freies Tyrosin verunreinigt, so daß der Tyrosinwert des Peptids in Wirklichkeit niedriger liegt.

Fraktion 10 wurde zwecks Klärung der genauen Aminosäuresequenz des Abbauproduktes mit Aminopeptidase unterzogen. Hierbei ergab sich folgende Sequenz:



Dieses Peptid würde entsprechend der von SANGER postulierten Insulinformel das Bruchstück der C-Ende des Insulins bilden. Auch alle übrigen aufgefundenen Peptide sind voll mit der postulierten Formel von SANGER verträglich. Eine Übersicht über die aufgefundenen Bruchstücke und ihre Einordnung in die SANGERsche Insulinformel ist in unserer Abbildung gegeben. Die Beziehungen zwischen Peptidstruktur und Verhalten am Ionenaustauscher sind aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4

Elution der aufgefundenen Peptide bzw. Aminosäuren aus der Austauschersäule. Reihenfolge geordnet nach steigendem Elutionsvolumen.

Fraktion Nr.	Bruchstück	Elutionsvol. (ml)
8	Leucin	1275
9	(Glu-Ala)	1305
10	Gly-Ileu-Val-Glu-Glu(NH ₂)	1390
14	Phenylalanin	1595
15	Val-Glu-Ala-Leu-Tyr (+ Tyrosin)	1645
17	Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu	1830
26	Thr-Pro-Lys-Ala	2910
28	Val-Asp(NH ₂)-Glu(NH ₂)-His-Leu	3210
40	Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala	4875

Tabelle 5

Wahre und theoretische Ausbeuten an aufgeklärten Peptiden, die durch Chymotrypsinabbau von Insulin entstanden sind.

Fraktion Nr.	Peptid	A u s b e u t e		
		Gew. % theor. *)	gef. **)	% d. Theor.
10	Gly-Ileu-Val-Glu-Glu(NH ₂)	10,8	0,45	4,1
15	Val-Glu-Ala-Leu-Tyr	11,61	0,89	7,7
17	Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu	16,2	0,19	1,2
28	Val-Asp-Glu-His-Leu NH ₂ NH ₂	14,6	2,26	15,5
26	Thr-Pro-Lys-Ala	8,2	1,79	21,8
40	Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala	11,3	5,5	48,4

*) Die theoretische Ausbeute ist unter der willkürlichen Annahme berechnet, daß das entsprechende Bruchstück durch hundertprozentige Durchspaltung aus dem Insulinmolekül entstanden wäre.

**) Die gefunden Ausbeute bezieht sich auf das reine, wasser- und salzfreie Peptid, das heißt, das im Gegensatz zur Tabelle 1 Verunreinigungen des Peptids entsprechend der quantitativen Aminosäureanalyse berücksichtigt sind.

Der Berechnung ist ein Molekulargewicht von 5734 für Insulin zugrundegelegt, was der kleinsten Einheit entspricht.

In Tabelle 5 sind die wahren den theoretisch errechneten Ausbeuten für die aufgeklärten Peptide gegenübergestellt. Die sehr wechselnden Ausbeuteverhältnisse dürften weniger auf unvollkommene Elution oder Verlust während der Trennung als vielmehr auf unvollkommene chymotryptische Spaltung zurückzuführen sein, was im Einklang mit der Vielzahl erhaltener Bruchstücke steht.

III. Zusammenfassung

Beim Abbau von Insulin mit Chymotrypsin entstehen 9 neue Carboxylgruppen pro Mol Insulin, die sich auf mindestens 24 verschiedene Bruchstücke verteilen. Die präparative Trennung dieser Bruchstücke, die mittels elektrophoretischer und verteilungschromatographischer Methoden versucht wurde, gelang in befriedigendem Maße mittels Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50-X2 unter Gradientenelution. Die Entsalzung der isolierten Peptidfraktionen gelang sowohl an Kationen-(Dowex 50-X2) als auch an Anionenaustauschern (Dowex 1-X2). Die Aufklärung von acht bereits an einer einzigen Säule in geprüft reiner Form isolierten Bruchstücken ergab eine volle Verträglichkeit mit der von SANGER postulierten Formel für Insulin. Die aufgeklärten Peptide sind im Formelschema für Insulin eingezeichnet. Durch die Isolierung und Sequenzaufklärung des Pentapeptids Gly-Ileu-Val-Glu-Glu(NH₂) ist die Unsicherheitsstelle am Aminoende der A-Kette im Insulin geklärt. Die Untersuchungen lieferten weiterhin neue Anhaltspunkte für den enzymatischen Angriff von Chymotrypsin auf Peptide. Neben der in der Literatur gut bekannten carboxylseitigen Spaltbarkeit von Tyrosyl- und Phenylalanyl-Bindungen sowie des selteneren Ereignisses der Spaltung von Leucyl- und Histidylbindungen durch Chymotrypsin wurde erstmals auch die chymotryptische Spaltung an der Carboxylseite von Glutamin nachgewiesen.

Lebenslauf

Am 18. Febr. 1929 wurde ich, Ernold G r a n z e r, als Sohn des Mittelschullehrers Erwin Granzer und seiner Ehefrau Herma, geb. Honke, in Troppau/Sudetenland geboren, wo ich auch die Volksschule und das humanistische Gymnasium besuchte. Nach der Vertreibung aus der Heimat im Jahre 1945 besuchte ich das Alte Gymnasium in Regensburg und legte dort 1947 das Abitur ab. Im Sommersemester 1948 begann ich mit dem Doppelstudium der Medizin und Chemie, zunächst an der erweiterten Phil.-Theol.Hochschule in Regensburg; nach bestandenen Physikum setzte ich das Studium 1950 an der Universität München fort. Nach mit "sehr gut" bestandener ärztlicher Prüfung erhielt ich am 23.5.1953 die Approbation als Arzt. Am 2.6.1953 promovierte ich mit einer Arbeit über "Elektrophoretische Studien an Infektionskrankheiten" an der Universität München "magna cum laude" zum Dr.med.

1954 legte ich in Regensburg die Diplom-Chemiker-Vorprüfung ab. Am 8.7.1955 unterzog ich mich an der Universität München der Diplom-Chemiker-Hauptprüfung. Anschließend fertigte ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß-und Lederforschung in Regensburg unter Prof. Dr.W.Graßmann meine Diplomarbeit an. Nach der im Herbst 1956 durchgeführten Verlegung des Institutes nach München konnte ich als Assistent am Institut vorliegende Inaugural-Dissertation anfertigen.

